Aus dem Pharmakologischen Institut der Freien Universität Berlin
Direktor: Professor Dr. med. Hans Herken

Über die hemmenden Wirkungen von Amilorid und Triamteren auf den stimulierten Glucosetransport und die stimulierte Lipolyse isolierter Fettzellen

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an der Medizinischen Fakultät
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Jürgen Streubel
aus Platkow

1970

Aus dem Pharmakologischen Institut der Freien Universität Berlin
Direktor: Professor Dr. med. Hans Herken

Über die hemmenden Wirkungen von Amilorid und Triamteren auf den stimulierten Glucosetransport und die stimulierte Lipolyse isolierter Fettzellen

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an der Medizinischen Fakultät
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Jürgen Streubel
aus Platkow

Dekan: Professor Dr. med. Herbert Lax

Referent: Professor Dr. med. Dipl.-Chem.
Franz v. Bruchhausen

Korreferent: Prof. Dr. med. Hans Herken

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Freien Universität Berlin

Promoviert am: 24.6.70

Inhaltsverzeichnis

I. Einleitung und Fragestellung

II. Material und Methoden

III. Ergebnisse

A. Wirkung von Amilorid und Triamteren auf die Lipolyse

1. Eigenwirkung der beiden Diuretika
2. Wirkung auf die durch Insulin gehemmte Lipolyse

B. Wirkung von Amilorid und Triamteren auf den durch Enzyme gesteigerten Glucosetransport

1. Steigerung des Glucosetransports durch Phospholipase A
   a) ohne Vorbehandlung der Fettzellen mit Phospholipase A
   b) nach Vorbehandlung der Fettzellen mit Phospholipase A
2. Steigerung des Glucosetransports durch proteolytische Fermente
   a) mit α-Chymotrypsin
   b) mit Trypsin
3. Wirkung der Diuretika auf kombinierte Steigerung des Glucosetransports
   a) kombinierte Steigerung des Glucosetransports durch Insulin + Phospholipase A
   b) kombinierte Steigerung des Glucosetransports durch Phospholipase A + α-Chymotrypsin

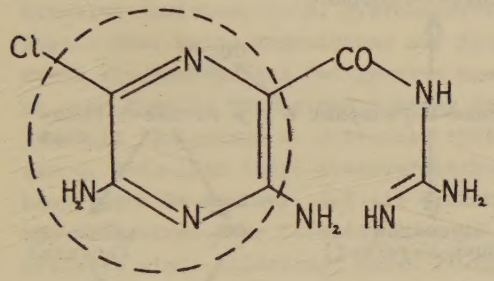
IV. Diskussion

V. Zusammenfassung

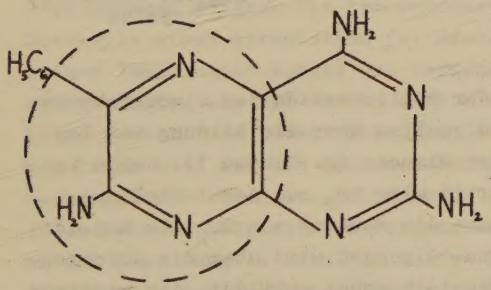
VI. Literaturverzeichnis

I. EINLEITUNG UND FRAGESTELLUNG

Bei früheren Untersuchungen von Stoffwechselvorgängen am intakten, epididymalen Fettgewebe der Ratte hat sich gezeigt, daß die beiden Diuretika Triamteren (v. Bruchhausen, Herken, Voss u. Merker 1967) und Amilorid (v. Bruchhausen, Kaiser u. Herken 1969) die Wirkung des Insulins



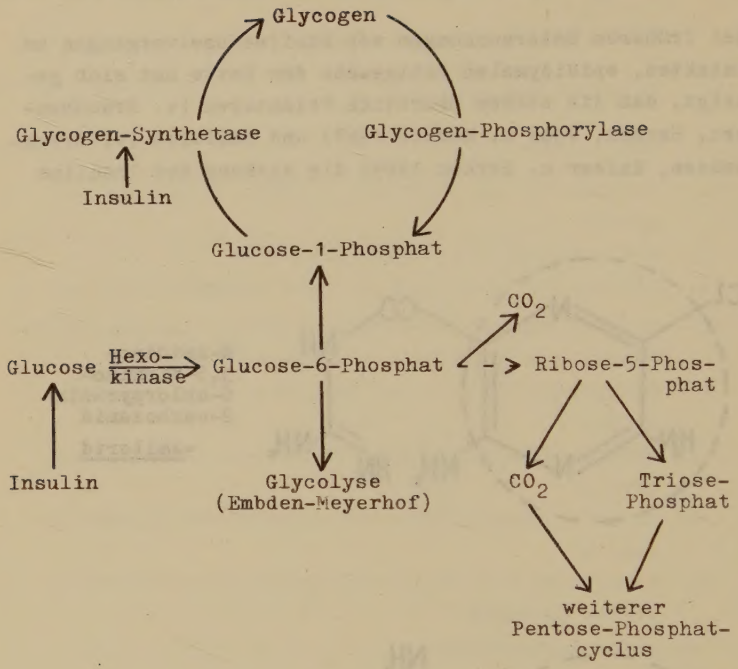
N-Amidino-
3,5-diamino-
6-chlorpyrazin-
2-carboxamid
=Amilorid



2,4,7-Triamino-
6-phenyl-pteridin
=Triamteren

am intakten Fettgewebe aufheben. So hemmten beide Substanzen - sie weisen gewisse Ähnlichkeiten in ihrer chemischen Struktur (s. Formeln) auf - in vitro die Insulin-abhängige Glucoseaufnahme ins Gewebe, die CO_2-Bildung aus Glucose (s. Schema 1),die Umwandlung von Glucose in Glycogen und den Einbau von Leucin in das Fett-

Schema 1

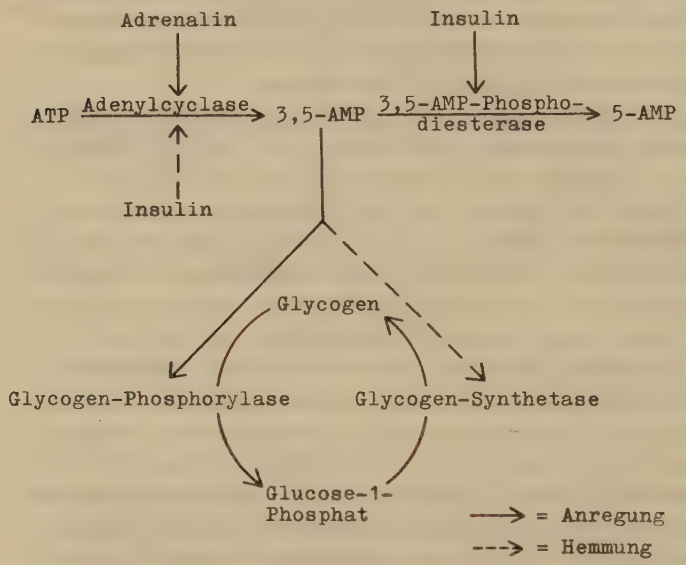


gewebsprotein. Eine der Möglichkeiten des Glucoseabbaus führt außerhalb der Glycolyse über die Bildung von Pentose zur Oxydation der Glucose (s. Schema 1). Schon im zweiten Reaktionsschritt wird CO_2 aus der 1-Stellung freigesetzt. Somit kann die Messung von CO_2 als Maß der Glucoseaufnahme dienen. Glycogen wird über die Glycogen-Synthetase aus Glucose-1-Phosphat gebildet, das wiederum mit Glucose-6-Phosphat in einem enzymatischen Gleichgewicht steht. Die Inkorporation von Leucin in das Fettgewebsprotein stellt ein Maß für die Proteinsynthese dar; der Einbau erfolgt in Verknüpfung mit einem energieliefernden Prozeß, wie z. B. dem Glucoseabbau. Alle diese Vorgänge werden durch Insulin angeregt. Der Wirkungsmechanismus von Amilorid und Triamteren am Fettgewebe

blieb bisher ungeklärt. Man weiß, daß sie sich in ihren renalen Wirkungen von anderen therapeutisch angewandten Diuretika dadurch unterscheiden, daß sie vorwiegend am distalen Teil des Nierentubulus angreifen (Ball u. Greene 1963; Baer, Jones, Spitzer u. Russo 1967) und neben der Na^+-Ausscheidung auch eine K^+-Retention bewirken (Baer et al. 1967; Wiebelhaus et al. 1965). Andere diuretisch wirksame Substanzen, die sowohl eine gesteigerte Na^+-Ausscheidung als auch K^+-Elimination bewirken, z. B. Hydrochlorothiazid und Furosemid, üben keine Hemmwirkung auf den Glucosetransport durch die Membran des Fettgewebes aus.
Da auch Insulin über einen Anstieg des Membranruhepotentials (Beigelman u. Hollander 1964; Miller, Schlosser u. Beigelman 1966) Ionenverschiebungen auslösen kann, wäre es denkbar, daß die Wirkungen von Amilorid und Triamteren über Veränderungen an Ionenfluxen zu erklären sind. Allerdings haben Fluxmessungen verschiedener Diuretika am Fettgewebe ergeben, daß diese beiden Substanzen keine wesentlichen Unterschiede des Na^+- und K^+-Fluxes gegenüber anderen diuretisch wirksamen Verbindungen zeigen, die den Glucosetransport in die Fettzelle nicht herabsetzen (v. Bruchhausen u. Bartelheimer 1968). Auch konnte bei Verwendung einseitig verarmter Medien wie Na^+-freier oder K^+-freier Außenmedien keine wesentliche Beeinträchtigung des Hemmvermögens von Triamteren auf die Glucoseaufnahme ins Fettgewebe nachgewiesen werden (v. Bruchhausen et al. 1967). Natrium scheint aber für den Vorgang der Glucosepermeation von Bedeutung zu sein. So fanden Letarte u. Renold (1967), daß der Insulin-stimulierte Glucosetransport an isolierten Fettzellen von der Na^+-Konzentration abhängig ist. Die Autoren vermuteten daher die Aktivierung eines sonst inaktiven Glucose-Carriers durch Insulin, wobei Na^+ benötigt wird.
Die Wirkungen des Insulins am Fettgewebe werden vielfach mit der verringerten Bildung cyclischen Adenosinmonophosphats (cAMP) im Gewebe (Jungas 1966; Sneyd,

Corbin u. Park 1968) bzw. dessen vermehrtem Abbau durch die cAMP-Phosphodiesterase - diesen Weg beschrieben Schultz, Senft, Losert u. Sitt (1966) sowie Senft, Losert, Schultz, Sitt u. Bartelheimer (1966) für das Hydrochlorothiazid - in Zusammenhang gebracht (s. Schema 2). Durch Hemmung des cAMP-bildenden Enzyms, der

Schema 2



Adenylcyclase (Jungas 1966; Blecher, Merlino u. Roane 1968; Müller-Oerlinghausen, Schwabe, Hasselblatt u. Schmidt 1968), kommt es zum Abfall der vorgebildeten Menge $cAMP_s$ im Gewebe (Butcher, Sneyd, Park u. Sutherland 1966; Butcher, Baird u. Sutherland 1968). Andererseits hemmt cAMP in Form seines Dibutyryl-Derivates auch den Glucosetransport durch die Fettzellmembran (Bray 1967; Blecher 1967) sowie den Aminosäurentransport ins Fettgewebe (v. Bruchhausen 1968).

Eine der empfindlichsten Reaktionen des cAMP stellt im Fettgewebe die Anregung der Lipolyse, d.h. der Spaltung von Triglyceriden in Glycerin und freie Fettsäuren, dar (Blecher 1967; Mosinger u. Vaughan 1967). Als Maß der Lipolyse können sowohl die Bildung von freien Fettsäuren als auch die Freisetzung von Glycerin dienen. In den vorliegenden Untersuchungen wird die Messung von Glycerin im Medium während der Inkubation der Fettzellen bevorzugt, weil diese Verbindung im Gegensatz zu den Fettsäuren nicht im Stoffwechsel wiederverwendet werden kann, sondern frei ins Medium permeiert (Jungas u. Ball 1963). Somit ist Glycerin, zumal die eingesetzten Substanzen Amilorid und Triamteren möglicherweise die Permeation der Fettsäuren durch die Zellmembran beeinflussen, der zuverlässigere Maßstab für den Grad der Lipolyse.
Durch Insulin kann die Lipolyse gehemmt werden, gleichgültig, ob ihre Stimulierung durch Adrenalin oder durch Dexamethason + Wachstumshormon (Fain, Kovaćev u. Scow 1965) erfolgt. Die Messung der Lipolyse gestattet daher eine Aussage, ob die Hemmung des Insulins durch Amilorid und Triamteren mit der Konzentration von cAMP im Gewebe in Zusammenhang steht.
Bei den bisher angeführten Untersuchungen konnte nicht entschieden werden, ob Amilorid und Triamteren gegenüber Insulin antagonistisch wirken, indem sie es funktionell ausschalten, oder ob es sich hier um eine Eigenwirkung der beiden Substanzen handelt, die dem Insulin zwar entgegengerichtet ist, aber bei dessen Anwesenheit nur stärker zur Geltung kommt.
Einige Enzyme, nämlich Phospholipase A und C (Blecher 1965,1966; Rodbell u. Jones 1966) sowie die Proteasen Trypsin und α-Chymotrypsin (Rieser u. Rieser 1964) besitzen die Fähigkeit, die Insulin-Wirkung nachzuahmen, indem sie trotz unterschiedlicher Grundmechanismen ebenfalls den Glucosetransport am Fettgewebe bzw. an isolierten Fettzellen stimulieren. Mit Hilfe dieser Enzyme sollte es möglich sein, den Einfluß von Amilorid

und Triamteren auf den Glucosetransport weiter abzugrenzen. Wenn die Hemmung spezifisch gegen Insulin gerichtet ist, muß man erwarten, daß die beiden Diuretika die Stimulierung des Glucosetransports durch andere Substanzen nicht beeinflussen, jedoch müßten sie sämtlichen durch Insulin stimulierbaren Prozessen, also auch der Lipolysehemmung, entgegenwirken.
Alle bisherigen Befunde wurden an isolierten Fettgeweben gewonnen. Durch Einwirkung von Kollagenase lassen sich sogenannte isolierte Fettzellen herstellen, die keine Basalmembran mehr besitzen und somit eine direktere Einwirkung von Substanzen an der Zellmembran der Zellen gestatten. Mit solchen Zellen lassen sich möglicherweise weitere Aufschlüsse über den Wirkungsmechanismus von Amilorid und Triamteren erzielen.
Durch den Vergleich mit anderen diuretisch wirksamen Substanzen wie Hydrochlorothiazid, Furosemid, Mefrusid und Äthacrynsäure, die alle nicht ausschließlich am distalen Teil des Tubulus angreifen und auch keine K^+-Retention bewirken, müßte sich klären lassen, ob diese Verbindungen ebenfalls die antilipolytische Wirkung des Insulins aufheben, oder ob sie sich in dieser Hinsicht tatsächlich anders verhalten als Amilorid und Triamteren.

II. MATERIAL UND METHODEN

Die benutzten Substanzen waren: Kollagenase aus Clostridium Welschii (Fa. Calbiochem, Luzern); Trypsin, 130000 E/g (Fa. Merck, Darmstadt); α-Chymotrypsin (Fa. Boehringer, Mannheim); Phospholipase A (Fa. Boehringer, Mannheim); Wachstumshormon vom Schwein B grade, 1 IE/mg Charge 55191 (Fa. Calbiochem, Luzern); Insulin vom Rind, 40 E/ml (Fa. Höchst, Frankfurt-Höchst); Dexamethasonacetat, Fortecortin (Fa. Merck, Darmstadt); Amilorid = n-Amidino-3,5-diamino-6-chlorpyrazincarboxamid (MK 870); Triamteren = 2,4,7-Triamino-6-phenylpteridin (Fa. Röhm u. Haas, Darmstadt); Mefrusid = 4-Chlor-N-methyl-N-(tetrahydro-2-methyl-furfuryl)-benzol-1,3-disulfonamid; Albumin vom Rind, reinst (Fa. Behringwerke, Marburg); [1-^{14}C]-Glucose, 2,8-2,9 mCi/mMol (Fa. The Radiochemical Centre, Amersham); Adrenalin (Fa. Merck, Darmstadt).

Die Herstellung isolierter Fettzellen (Adipocyten) folgte im wesentlichen der Beschreibung von Rodbell (1964). Die epididymalen Fettgewebe wurden männlichen Wistar-Ratten im Gewicht von 140-160 g entnommen. Das Fettgewebe wurde mit 15 mg Kollagenase pro 1 g Fettgewebe in Polyäthylengefäßen inkubiert, wobei die Temperatur des Mediums, auch bei den Waschvorgängen, mit 37° C stets konstant blieb. Die Inkubationszeit zur Isolierung der Fettzellen dauerte zwischen 90 und 100 min. Als Inkubationsmedium diente eine Krebs-Henseleit-Bikarbonatpufferlösung mit halbem Calciumgehalt und 4 % Albumin, die mit einem Gasgemisch von 95 % O_2 und 5 % CO_2 gesättigt wurde. Nach dreimaligem Waschen und Zentrifugieren bei 3000 U/min. - die gewebehaltigen Fragmente, die sich im Gegensatz zu den an der Oberfläche schwimmenden Fettzellen am Boden des Zentrifugenröhrchens abgesetzt hatten, wurden nach dem Zentrifugieren jeweils mit einem Kunststoffschlauch abgesaugt und verworfen, danach die Fettzellen mit frischem Medium versehen und anschließend zentrifugiert - wurde unter ständigem vorsichtigen Rühren mit einem Plastikstab die Fettzellsuspension in einen Kunststoffschlauch gesaugt

und möglichst gleichmäßig in die vorher fertiggestellten Ansätze verteilt. Die Inkubation der Ansätze erfolgte nach abermaliger Absättigung mit 95 % O_2/5 % CO_2 und nachfolgender Zugabe markierter Glucose (0,1 µC/0,1 ml H_2O) in einem Medium, das 2 % Albumin enthielt.
Die Menge der jeweils eingesetzten Fettzellsuspension wurde durch die Triglyceridbestimmung nach Rapport und Alonzo (1955) erfaßt, die Meßwerte auf den ermittelten Triglyceridgehalt umgerechnet. Die Lipolyseanregung erfolgte in Anlehnung an Fain, Kovaćev u. Scow (1965) durch kombinierten Zusatz von Dexamethason (0,16 µg/ml) und Wachstumshormon (10 µg/ml); die Inkubationszeit betrug hier 4 Std. Der Versuch, in dem Adrenalin die Lipolyse stimulierte, lief über 2 Std.; Adrenalin wirkte in einer Konzentration von 0,5 µg/ml. In die Dex./WH-haltigen Ansätze wurden 100 bzw. 200 µE/ml Insulin zugesetzt, in den Adrenalin-Ansatz 1 mE/ml. Nach Beendigung der Inkubation wurden die Ansätze in Reagensgläser umgefüllt und mit je 2 ml Chloroform ausgeschüttelt. Die Messung des Glycerins im Medium erfolgte in abgewandelter Form nach der Methode von Hanahan u. Olley (1958). Aus jedem Ansatz kamen 0,5 ml als Probe zur Bestimmung, das entspricht einem Viertel des Ansatzes (2 ml); diese wurden mit 0,1 ml 0,4 N H_2SO_4 und danach mit 0,1 ml 0,1 M $NaJO_4$-Lösung versetzt, die Ansätze 5 min. stehengelassen, dann 0,1 ml 10 %-ige $NaHSO_3$-Lösung und schließlich 3,5 ml eines Gemisches von 10 ml 1 %-iger Chromotropsäure in 45 ml 24 N H_2SO_4 zugegeben. Das so erhaltene Gemisch wurde 30 min. im Wasserbad gekocht, danach abgekühlt und mit 0,35 ml halbgesättigter Thioharnstoff-Lösung versehen und ausgeschüttelt. Die violett gefärbten Proben wurden am Eppendorf-Photometer bei 578 mµ photometriert, die erhaltenen Extinktionen dann auf die jeweilige Glycerinmenge umgerechnet.
Alle Ansätze, in denen die $^{14}CO_2$-Bildung aus [1-^{14}C]-Glucose zu messen war, enthielten 1 µMol/ml unmarkierte Glucose im Medium. Phospholipase A wurde in optimal auf den Glucosetransport wirksamer Konzentration (2,5-5 µg/ml) eingesetzt, ebenso α-Chymotrypsin (150 µg/ml) und Trypsin

(10 bzw. 150 µg/ml).
Die Inkubationszeit für die Ansätze betrug 2 Std.; anschließend wurde im geschlossenen System durch Ansäuerung des Mediums mit 0,25 ml 10 %iger H_2SO_4 das gebildete $^{14}CO_2$ freigesetzt. Zum Auffangen der $^{14}CO_2$ wurden gleichzeitig 0,4 ml Hyamin ebenfalls in das geschlossene System, jedoch außerhalb des Inkubationsmediums, eingespritzt. Als Behälter für das Hyamin dienten die abgesägten Bodenteile dünner Reagensgläser, die durch aufhängbare, aus Plastikmänteln zurechtgeschnittene Zylinder am Oberrand der Inkubationsgefäße gehalten wurden. Während einer 35-40minütigen Nach-Inkubation im geschlossenen System konnte sich die $^{14}CO_2$ entwickeln und an das Hyamin binden. Danach wurden die Glaseinsätze mitsamt dem Hyamin und der gebundenen $^{14}CO_2$ in 10 ml Szintillatortoluol eingefüllt, das 40 mg PPO und 0,5 mg POPOP (Fa. Packard) enthielt. Die Radioaktivitätsbestimmung erfolgte im Szintillationszähler (Fa. Packard). Die Umrechnung der gemessenen Impulse in nC erfolgte nach Korrektur der gemessenen Zahlenwerte mit Hilfe der inneren Standardisierung mit Toluol-Standardlösung (Vergleichslösung mit einer bekannten Zerfallsrate). Alle Angaben stellen Mittelwerte mit Standardabweichungen aus 4-6 Bestimmungen dar. Die statistische Sicherung erfolgte rechnerisch nach Students t-Methode mit graphischer Endauswertung nach Pätau (1943). Zur Berechnung des p-Wertes wurde zunächst der Mittelwert aus den Ergebnissen der 4-6 Bestimmungen errechnet (Mittelwert: $\bar{x} = \frac{\sum x_i}{n}$). Die Differenzen aus diesem Mittelwert und den jeweiligen Einzelwerten wurden ins Quadrat gesetzt, die Summe der Quadrate ($\sum(\bar{x}-x_i)^2$) durch n (n-1) dividiert, wobei n jeweils die Zahl der Bestimmungen aus gleichartigen Ansätzen einer Reihe angibt. Auf die gleiche Art wie der so erhaltene Wert ε_1^2 wird ε_2^2 aus den Ergebnissen der Vergleichsreihe (mit unterschiedlichen Substanzen gegenüber den vorhergehenden Ansätzen) errechnet. Die Differenz der beiden Mittelwerte ($\bar{x}_1-\bar{x}_2$), dividiert durch die Wurzel aus der Summe der ε-Quadrate, ergibt den t(T)-Wert ($t = \frac{\bar{x}_1-\bar{x}_2}{\sqrt{\varepsilon_1^2+\varepsilon_2^2}}$). Aus diesem t-Wert

läßt sich unter Berücksichtigung der Freiheitsgrade (F) der p-Wert graphisch ermitteln. Streuungen werden in den Abbildungen als Standardabweichungen angegeben.

III. ERGEBNISSE

A. Wirkung von Amilorid und Triamteren auf die Lipolyse

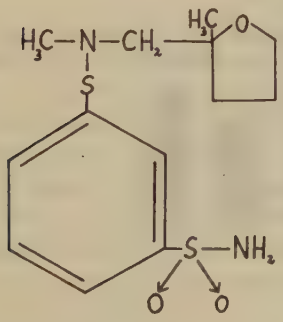
1. Eigenwirkung der beiden Diuretika

Amilorid und Triamteren steigern selbst die Glycerin-Freisetzung nicht (s. Tab. 1). Amilorid übt, wie die Tabelle veranschaulicht, sogar einen gering antilipo-

Tab. 1: Einfluß von Amilorid, Triamteren und Mefrusid auf die Lipolyse isolierter Fettzellen

	Kontrolle	Amilorid 10^{-3} M	Triamteren $2x10^{-4}$ M	Mefrusid 10^{-3} M
Glycerin (µg/100mg Triglycerid	167,6 ± 6,0	126,8 ± 12,0 p=0,011	153,6 ± 27,2 p=0,5	100,8 ± 15,2 p=0,0003

lytischen Einfluß aus, während unter Triamteren keinerlei Wirkung auf die Lipolyse sichtbar ist. Demgegenüber



4-Chlor-N-methyl-N-(tetrahydro-2-methyl-furfuryl)-benzol-1,3-disulfonamid

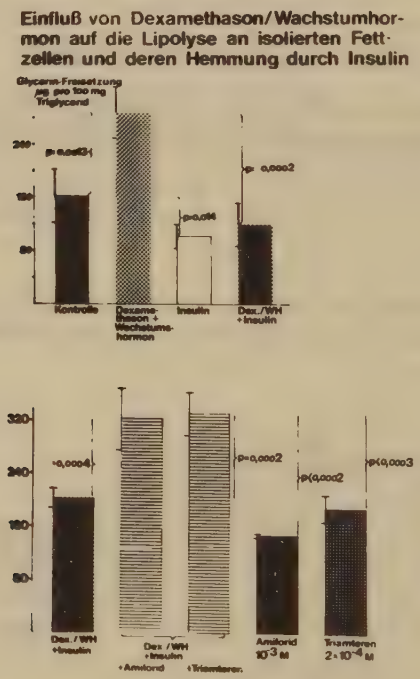
=Mefrusid

zeigt Mefrusid (s. Formel) eine ausgeprägte antilipolytische Wirkung.

2. Wirkung auf die durch Insulin gehemmte Lipolyse

Als stimulierendes Agens der Lipolyse dient in den folgenden Untersuchungen die Kombination von Dexamethason (0,16 µg/ml) und Wachstumshormon (10,0 µg/ml). Die Glycerinabgabe betrug dabei das 1 1/2-2fache des Kontrollwertes (Abb. 1 oben). Diese Wirkung konnte durch Insulin (200 µE/ml) vollständig aufgehoben werden; dabei

Abb. 1

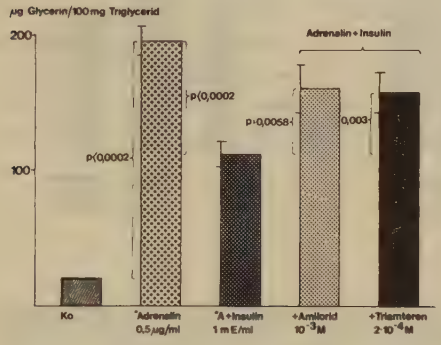


wurde sogar der Kontrollwert unterschritten. Insulin für sich allein bewirkt nur eine geringere antilipolytische Wirkung als in Kombination mit Dex./WH. Diese Befunde bestätigen die Ergebnisse von Fain et al. 1966

(Abb. 1 oben). Nicht ganz so eindrucksvoll ist dagegen der hemmende Effekt des Insulins auf die Adrenalin-stimulierte Lipolyse (Abb. 2).

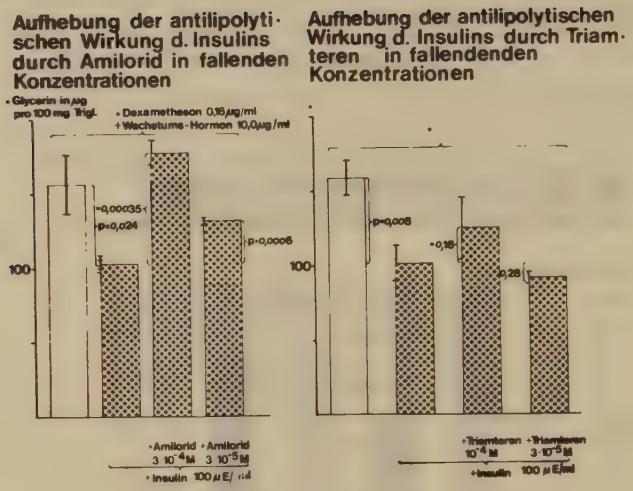
Abb. 2

AUFHEBUNG DER ANTILIPOLYTISCHEN WIRKUNG DES INSULINS DURCH AMILORID U. TRIAMTEREN BEI DER DURCH ADRENALIN GESTEIGERTEN LIPOLYSE



Unabhängig von der stimulierenden Substanz kann diese Insulinwirkung durch Amilorid und Triamteren aufgehoben werden; dies tritt bei der Dex./WH-stimulierten Lipolyse besonders deutlich hervor (Abb. 1 unten). Die Insulinkonzentration betrug in diesem Versuch wie auch in den folgenden Untersuchungen 100 µE/ml, die des Amilorid 10^{-3} M, die des Triamteren 2 x 10^{-4} M. Bei einer Konzentration von 3 x 10^{-5} M (Amilorid) bzw. 10^{-4} M (Triamteren) ist die Insulin-aufhebende Wirkung noch halbmaximal (Abb. 3).
Anders als Amilorid und Triamteren vermag Mefrusid (10^{-3} M) die Insulinwirkung nicht aufzuheben, sondern verstärkt sogar im Gegenteil den Insulineffekt noch (s. Tab. 2). Ein Vergleich dieser beiden Substanzen mit

Abb. 3



dem Verhalten von Hydrochlorothiazid, Furosemid und Äthacrynsäure scheiterte daran, daß letztere mit der

Tab. 2: Einfluß von Mefrusid auf die antilipolytische Wirkung des Insulins auf die durch Dex./WH stimulierte Lipolyse

	Kontrolle	Dex./WH	Dex./WH +Insulin	Dex./WH+Ins. +Mefrusid 10^{-3}M
Glycerin (µg/100mg Triglycerid	270,2 ± 43,9	433,7 ± 45,5	212,2 ± 7,5	120,4 ± 22,5 p=<0,0002

Bestimmungsmethode interferierten und somit keine verbindliche Aussage hinsichtlich ihres Verhaltens gegenüber Insulin erlaubten.

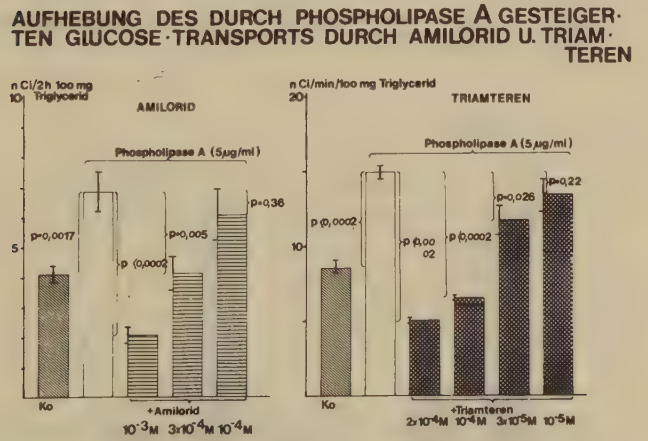
B. Wirkung von Amilorid und Triamteren auf den durch Enzyme gesteigerten Glucosetransport

1. Steigerung des Glucosetransports durch Phospholipase A

a) ohne Vorbehandlung der Fettzellen mit Phospholipase A

Mit Phospholipase A (5 µg/ml) läßt sich der Glucosetransport an isolierten Fettzellen, gemessen an der $^{14}CO_2$-Bildung aus [1-^{14}C]-Glucose, auf fast das Doppelte des Kontrollwertes steigern. Amilorid und Triamteren hemmen diesen Vorgang bei Konzentrationen von 10^{-3} M bzw. 2×10^{-4} M (Abb. 4) und bewirken in Anwesenheit von

Abb. 4



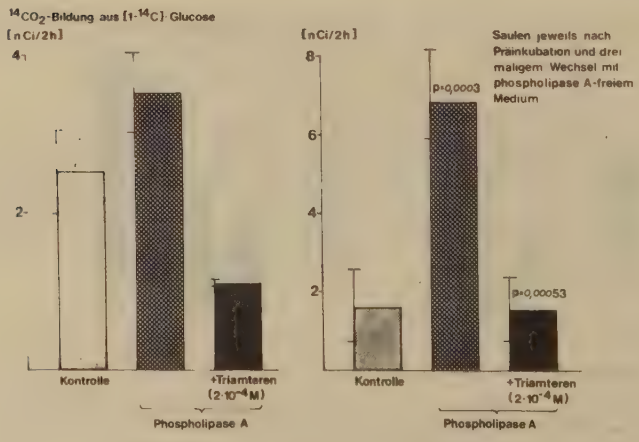
Phospholipase A sogar eine Verminderung der $^{14}CO_2$-Bildung weit unter den Kontrollwert. Die Substanzen werden

jeweils zu Beginn einer 2-stündigen Inkubationszeit zusammen mit Phospholipase A in die Ansätze gegeben. Während die anregende Wirkung der Phospholipase A durch Amilorid bei einer Konzentration von 3 x 10^{-4} M etwa halbmaximal und bei 10^{-4} M schon nicht mehr sicher eingeschränkt ist, wirkt Triamteren bei einer Konzentration von 10^{-4} M noch sehr stark und bei 3 x 10^{-5} M noch deutlich hemmend.

b) nach Vorbehandlung der Fettzellen mit Phospholipase A

Der hemmende Effekt der beiden Diuretika gegenüber Phospholipase A kann auch dann beobachtet werden, wenn die Fettzellen 1 1/2 Std. lang mit Phospholipase A vorinkubiert werden, das Enzym durch dreimaliges Auswaschen mit Phospholipase-freiem Medium unwirksam gemacht wird und erst daran anschließend die diuretischen Substanzen auf die Fettzellen, wiederum 1 1/2 Std. lang, ein-

Abb. 5: Bestehenbleiben des Phospholipase A-Effektes und Triamteren-Hemmeffektes nach Auswaschen von Phospholipase A



wirken. Das Ausmaß dieses Effektes ist deshalb nicht genau anzugeben, weil durch den Vorgang des Auswaschens auch ein Teil der Fettzellen verloren geht. Es schien daher nicht sinnvoll, hier einen bestimmten Triglyceridgehalt als Bezugssystem anzugeben. Die durch Phospholipase A erzielbare Steigerung der Glucoseaufnahme erhöht sich in dieser Versuchsanordnung gegenüber der Kontrolle beträchtlich im Vergleich zu den Ansätzen, in denen Amilorid und Triamteren schon zu Beginn der Inkubationszeit eingesetzt wurden (Abb. 5, Tab. 3). Der

Tab. 3: Bestehenbleiben des Phospholipase A-Effektes und Amilorid-Hemmeffektes nach Auswaschen von Phospholipase A

	vor dem Auswaschen			nach dem Auswaschen		
	Kontr.	+Ph. A	Ph. A+ Amilorid	Kontr.	Ph. A	Ph. A+ Amilorid
$^{14}CO_2$-Bildung aus [1-^{14}C]-Glucose	2,13 ±0,35	2,25 ±0,31	0,97 ±0,10	0,42 ±0,06	0,78 ±0,13	0,37 ±0,09
	($^{14}CO_2$ in nC/2h)				p=0,016	

Kontrollwert liegt nach dem Auswaschen der Phospholipase A verständlicherweise niedriger als die Kontrollen vor dem Waschen. Im übrigen verhalten sich Amilorid und Triamteren auch in dieser Versuchsanordnung gleichartig. Beide Substanzen senken die CO_2-Bildung in den Fettzellen, die mit Phospholipase A vorbehandelt wurden, in demselben Maße, wie sie es in Anwesenheit von Phospholipase A tun.

2. Steigerung des Glucosetransports durch proteolytische Fermente

a) mit α-Chymotrypsin

α-Chymotrypsin (150 µg/ml) bewirkt eine Steigerung der $^{14}CO_2$-Bildung aus [1-^{14}C]-Glucose um etwa 50% gegenüber

Abb. 6

Aufhebender Effekt des Amilorid auf den durch α-Chymotrypsin gesteigerten Glucose-Transport

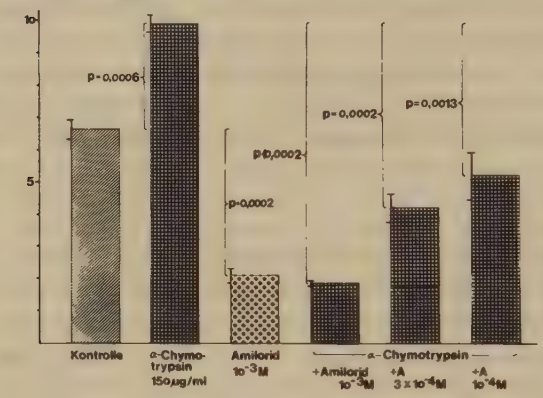
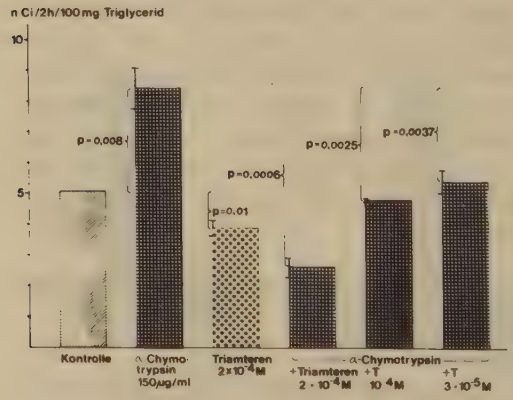


Abb. 7

Aufhebender Effekt des Triamteren auf den durch α-Chymotrypsin gesteigerten Glucose-Transport



dem Kontrollwert. Auch die Stimulierung der Glucoseaufnahme durch α-Chymotrypsin kann durch Amilorid und Triamteren vollständig, bei Konzentrationen von 10^{-3} M (Amilorid) bzw. 2 x 10^{-4} M (Triamteren) sogar bis weit unter die Kontrolle gesenkt werden. Eine halbmaximale Hemmung des Enzyms wird bei einer Konzentration der beiden diuretisch wirksamen Substanzen von jeweils 10^{-4} M erreicht (Abb. 6 u. 7).
Ein ähnliches Ergebnis, wie wir es schon nach dem Auswaschen der Phospholipase A und darauf folgender Behandlung der Fettzellen mit Amilorid und Triamteren erhalten haben, läßt sich gleichermaßen auch gewinnen, wenn man α-Chymotrypsin statt Phospholipase A einsetzt und auch auswäscht (eigene Versuche).

b) mit Trypsin

Ganz ähnliche Verhältnisse liegen vor, wenn statt α-Chymotrypsin als stimulierender Substanz zur Förderung der Glucoseaufnahme Trypsin eingesetzt wird. Trypsin bewirkt in einer Konzentration von 10 bzw. 150 µg/ml eine Steigerung der $^{14}CO_2$-Bildung um ebenfalls ca. 50 %; auch hier ist die stimulierende Wirkung des proteolytischen Ferments vollständig durch Zugabe von Amilorid (10^{-3} M) und Triamteren (2 x 10^{-4} M) aufzuheben (Abb. 8 u. 9). Die halbmaximalen Wirkungen der Diuretika liegen hier bei 3 x 10^{-5} M, Triamteren bewirkt sogar noch bei 10^{-5} M eine deutliche Hemmung. Besonders deutlich läßt sich in den Abbildungen erkennen, daß der Hemmeffekt, den die beiden Diuretika in Gegenwart von Trypsin ausüben, sich überhaupt nicht unterscheidet von demjenigen, den sie für sich allein bei Abwesenheit des Enzyms bewirken. Ähnliches ließ sich auch schon am Beispiel des α-Chymotrypsins zeigen. Die Eigenwirkung von Amilorid und Triamteren auf den Glucosetransport äußert sich also in einer gegenüber dem Kontrollwert sehr deutlichen Verminderung der $^{14}CO_2$-Bildung und ist für beide Diuretika bei den vorgegebenen Konzentrationen gleich stark.

Abb. 8

HEMM·WIRKUNG DES AMILORID AUF DEN DURCH TRYPSIN STIMULIERTEN GLUCOSE·TRANSPORT

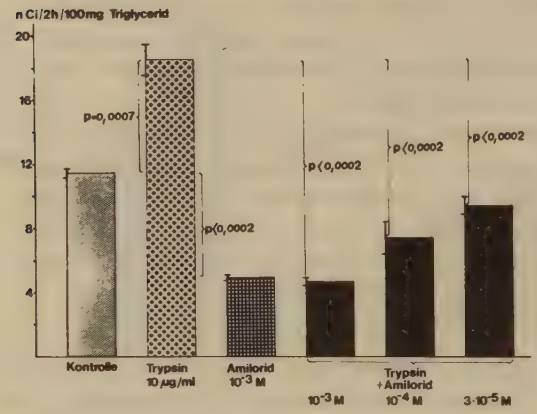
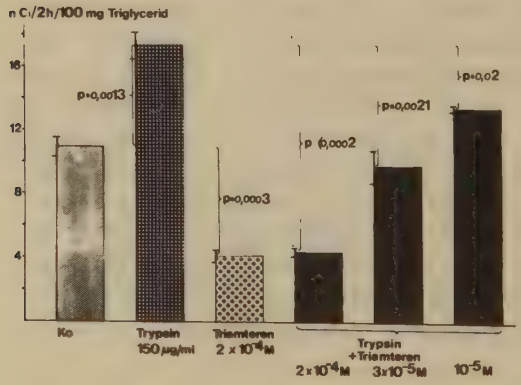


Abb. 9

HEMM-WIRKUNG DES TRIAMTEREN AUF DEN DURCH TRYPSIN STIMULIERTEN GLUCOSE-TRANS·PORT

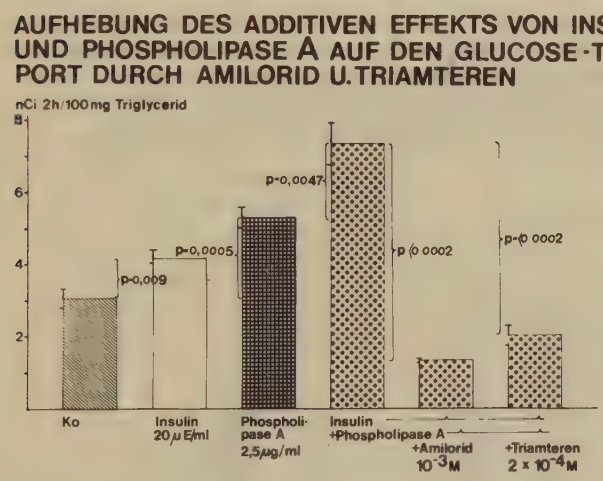


3. Wirkung der Diuretika auf kombinierte Steigerung des Glucosetransports

a) kombinierte Steigerung des Glucosetransports durch Insulin + Phospholipase A

Insulin und Phospholipase A zeigen, wenn sie zusammen in submaximaler (Insulin) bzw. optimaler (Phospholipase A) Konzentration (20 µE/ml bzw. 2,5 µg/ml) eingesetzt werden, eine additive Stimulierung der $^{14}CO_2$-Bildung im Vergleich zur Einzelwirkung der beiden Substanzen

Abb. 10



(Abb. 10). Dies weist darauf hin, daß beide Verbindungen über einen unterschiedlichen Mechanismus den Glucosetransport in die Fettzellen steigern. Auch dieser additive Effekt wird durch Amilorid und Triamteren in den bisher üblichen Konzentrationen vollständig und bis unter den Kontrollwert aufgehoben (Abb. 10). Dieses ist ein weiterer Beweis dafür, daß Amilorid und Triamteren

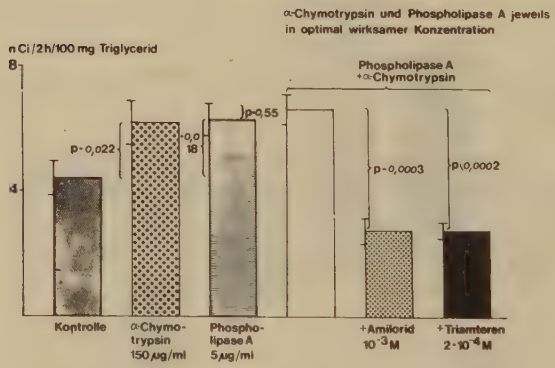
in der Lage sind, Substanzen, die stimulierend auf den Glucosetransport an Fettzellen einwirken, trotz deren wahrscheinlich unterschiedlicher Grundwirkung zu hemmen.

b) kombinierte Steigerung des Glucosetransports durch Phospholipase A + α-Chymotrypsin

Der folgende Versuch zeigt, daß Phospholipase A und α-Chymotrypsin, wenn beide zusammen jeweils in optimal stimulierender Konzentration (5 µg/ml bzw. 150 µg/ml) eingesetzt werden, keine additive Stimulierung des Glucosetransports bewirken. Abermals heben Amilorid und

Abb. 11

HEMMENDE WIRKUNG VON AMILORID UND TRIAMTEREN AUF DEN DURCH α-CHYMOTRYPSIN + PHOSPHOLIPASE A GESTEIGERTEN GLUCOSE-TRANSPORT



Triamteren die kombinierte Steigerung des Glucosetransports in den bisher angewandten Konzentrationen auf (Abb. 11).

IV. DISKUSSION

Die untersuchten Substanzen Amilorid und Triamteren bewirken keine Steigerung der Glycerinfreisetzung isolierter Fettzellen. Eine andere diuretisch wirksame Verbindung, Mefrusid, zeigt dagegen eine deutliche Herabsetzung der Glycerinfreisetzung.
Die durch Dexamethason + Wachstumshormon stimulierte Lipolyse kann durch Insulin (Fain et alii 1966) gehemmt werden, was in den vorliegenden Untersuchungen bestätigt wird. Amilorid und Triamteren heben, obwohl sie selbst kaum einen Einfluß auf die Lipolyse ausüben, diese Wirkung des Insulins auf, so daß die stimulierenden Agentien auch in Gegenwart von Insulin überwiegen, wenn eins der beiden Diuretika zugesetzt wird. Mefrusid hingegen wirkt im Sinne des Insulins und verstärkt in einer Konzentration von 10^{-3} M noch dessen antilipolytischen Effekt, wenn beide zusammen eingesetzt werden. Ein Vergleich mit weiteren diuretisch wirksamen Substanzen scheiterte aus den genannten Gründen.
Die antilipolytische Wirkung des Insulins ist wahrscheinlich unabhängig von seinem Einfluß auf den Glucosetransport. Dafür spricht, daß Insulin auch bei Fehlen von Glucose im Inkubationsmedium antilipolytisch wirksam ist und für diese Wirkung wesentlich geringere Konzentrationen an Insulin ausreichen, als für die Steigerung des Glucosetransports benötigt werden (Fain et al. 1966).
Die Lipolyse-hemmende Wirksamkeit des Insulins wird von manchen Autoren (Rodbell u. Jones 1966; Jungas 1966) mit der Konzentration an cyklischem Adenosinmonophosphat im Gewebe in Zusammenhang gebracht. Dieses cAMP ist, wie schon in der Einleitung erwähnt, an Transportvorgängen beteiligt; sein Dibutyrylderivat hemmt den Glucosetransport (Bray 1967; Blecher 1967) wie auch den Aminosäurentransport ins Fettgewebe (v. Bruchhausen 1968). Insulin verursacht einen Abfall von cAMP im Gewebe (Butcher et al. 1966; Jungas 1966; Butcher et al. 1968) wahrscheinlich über eine Hemmung des cAMP-bildenden Enzyms, der Adenylcyclase (Jungas 1966; Blecher et

al. 1968; Müller-Oerlinghausen et al. 1968). Es erscheint in diesem Zusammenhang bedeutungslos, ob Insulin auch durch Aktivierung des cAMP-abbauenden Ferments, der cAMP-Phosphodiesterase (Senft et al. 1966) eine Verminderung der cAMP-Konzentration bewirkt. Auf alle Fälle erscheint es fraglich, ob sich Änderungen der Enzymaktivität, d. h. der Adenylcyclase- bzw. der Phosphodiesterase-Aktivität, auf die cAMP-Konzentration überhaupt auswirken. Sneyd et al. (1968) haben darauf hingewiesen, daß die Lipolysehemmung durch Insulin nicht regelmäßig mit einem Abfall der cAMP-Konzentration im Gewebe verbunden ist. Mosinger und Vaughan (1967) beobachteten darüber hinaus, daß cAMP unter bestimmten Bedingungen die Lipolyse nicht stimuliert, sondern hemmt.

Ein direkter Antagonismus von Amilorid und Triamteren gegenüber Insulin im Sinne einer Erhöhung der cAMP-Konzentration erscheint auch deshalb unwahrscheinlich, weil diese Substanzen keinen stimulierenden Einfluß auf die Lipolyse ausüben. Eine direkte Messung des cAMP könnte Aufschluß darüber geben, ob mit Amilorid und Triamteren ein Abfall der cAMP-Konzentration im Fettgewebe, wie er durch Insulin hervorgerufen werden soll, verhindert wird.

Es erscheint auch fraglich, ob Insulin ausschließlich über eine Verminderung der cAMP-Konzentration antilipolytisch wirkt. Zwar ist dies für die Hemmung der Adrenalin-Lipolyse durchaus mit den derzeitigen Vorstellungen vereinbar. Die Lipolyse durch Dexamethason + Wachstumshormon aber, die allem Anschein nach nicht über das cAMP-System stimuliert wird, erfolgt wahrscheinlich über die Bildung eines Proteins, evtl. Enzyms, das von der DNS-abhängigen RNS-Synthese (Fain 1967) abhängt. Dafür spricht auch, daß die Lipolyse durch Dexamethason + Wachstumshormon im Gegensatz zu der durch Adrenalin erst nach einer Latenzzeit von 2 Std. einsetzt (Fain et al. 1965; Fain 1967), sowie die Tatsache, daß Hemmstoffe wie das Antibiotikum

Actinomycin D, das die DNS-abhängige RNS-Synthese hemmt, und Puromycin, ein spezifischer Hemmer der Proteinsynthese, nur die Lipolyse durch Dex./WH verhindern (Fain et al. 1965; Fain 1967). Andererseits hemmt aber Insulin sowohl die Dex./WH-stimulierte wie auch die Adrenalin-stimulierte Lipolyse gleichermaßen. Amilorid und Triamteren wiederum heben, ebenfalls unabhängig von der Art der Stimulierung, die antilipolytische Wirkung des Insulins in beiden Fällen auf. Vorläufig muß angenommen werden, daß diese Wirkung der beiden Diuretika unspezifisch ist.

Von Bleicher et al. (1966 a) ist ein Zusammenhang zwischen den hormonellen lipolytischen Agentien und einem von Na^+ und K^+ ausgeübten Effekt auf die in vitro-Lipolyse vermutet worden; an diesem Vorgang könnten nach Ansicht der Autoren auch Gewebskatecholamine mitbeteiligt sein. Sie haben weiter herausgefunden, daß die Lipolyse in bestimmtem Umfang durch veränderte Konzentrationen von Na^+ und K^+ im Medium auch in Abwesenheit lipolytisch wirksamer Hormone aktiviert werden kann. K^+ soll von allen Kationen die größte lipolytische Potenz besitzen (Bleicher et al. 1966 b; Mosinger u. Kujalovà 1966). In der Hauptsache scheint danach die Konzentration von Na^+ und K^+ im Medium für die Ansprechbarkeit des Fettgewebes auf lipolytische Agentien eine Rolle zu spielen. Eigene Versuche haben ergeben, daß sich die lipolytische Wirksamkeit von Dexamethason + Wachstumshormon im Na^+-armen bzw. K^+-armen Außenmedium nicht wesentlich veränderte im Vergleich zum normalen Medium. Die Anwesenheit von Ca^{++} im Medium soll die Lipolyse stimulieren (Bleicher et al. 1966), wenn gleichzeitig der Gehalt von K^+ oder Na^+ nicht maximal erhöht ist. In reinem K^+-Medium wirkt Ca^{++} dagegen hemmend, in reinem Na^+-Medium zeigte es keinerlei Wirkung. Interessanterweise kann Ca^{++} durch Aktivierung eines zellfreien Adrenalin-empfindlichen lipolytischen Systems genauso wie cAMP zur Lipolyse führen (Rizack 1964), wenn gleichzeitig Mg^{++} und ATP vorhanden sind.

Mosinger u. Kujalovà (1966) haben gefunden, daß Ca^{++} andererseits für die Lipolyse durch Adrenalin nicht nötig ist. Sie vermuteten eine Beziehung zwischen der Adrenalin-Lipolyse und dem aktiv transportierten K^+. Dieser K^+-Effekt soll durch aktive Hormonaufnahme durch die Zellmembran der Fettzelle hervorgerufen werden. Auch die durch cAMP bewirkte Stimulierung der Lipolyse muß im Zusammenhang mit dem Flux bestimmter Kationen gesehen werden. Der stimulierende Effekt des cAMP wurde nicht deutlich oder sogar herabgesetzt, wenn die basale Glycerinfreisetzung schon sehr hoch lag, und wenn K^+, Mg^{++}, Ca^{++}, Ouabain oder Adrenalin mitbeteiligt waren.

Wir wissen nicht, wie Insulin auf die Membranfunktion selbst einwirkt, und ob Stoffwechselvorgänge der Zelle wie z. B. die Lipolyse davon beeinflußt werden. Eine Steigerung des Membranruhepotentials durch Insulin ist sowohl am Fettgewebe (Beigelman u. Hollander 1964) wie auch gleichermaßen an isolierten Fettzellen (Miller et al. 1966) nachgewiesen worden. Eine unter Insulin verursachte K^+-Anreicherung (Zierler 1959) am Fettgewebe konnte durch Triamteren jedoch nicht aufgehoben werden (Bartelheimer u. v. Bruchhausen 1966). Weitere Hinweise für enge Zusammenhänge zwischen Vorgängen an der Zellmembran und der Lipolyse ergeben sich aus der antilipolytischen Wirkung anderer Substanzen wie Phospholipase C und proteolytischer Hormone. Insulin soll nach Crofford u. Renold (1965) am eigentlichen Transportmechanismus der Zellmembran des Fettgewebes angreifen.

Alles in allem läßt die Enthemmung der hormonstimulierten und durch Insulin wieder gehemmten Lipolyse durch Amilorid und Triamteren, zugleich mit einer fehlenden eigenständigen lipolytischen Wirkung dieser beiden letzten Substanzen, fraglich erscheinen, ob die Diuretika unmittelbar im cAMP-System angreifen. Die Wahrscheinlichkeit spricht eher dafür, daß es sich hier um einen viel weniger spezifischen Prozeß handelt, der

jedenfalls nicht allein auf einem direkten Insulinantagonismus beruht.

Amilorid und Triamteren setzen an isolierten Fettzellen die $^{14}CO_2$-Bildung aus [1-^{14}C]-Glucose herab, für Amilorid wurde diese Wirkung bereits am intakten Fettgewebe beschrieben (v. Bruchhausen et al. 1968). Das CO_2 wird, wie bereits in der Einleitung beschrieben wurde, während des Abbaus der Glucose über den Pentosephosphatcyclus (s. Schema 1) gebildet und kann somit als Maß der Glucoseverwertung dienen. Die für die Herabsetzung der $^{14}CO_2$-Bildung benötigten Konzentrationen von Amilorid und Triamteren entsprechen an isolierten Fettzellen denen, die am intakten Fettgewebe wirksam sind. Gleichermaßen hemmend wirken die beiden Diuretika auf die Glucoseaufnahme auch in Gegenwart von Fermenten wie Phospholipase A, α-Chymotrypsin und Trypsin, die ebenfalls den Glucosetransport an isolierten Fettzellen steigern. Ihre Wirkung beschränkt sich somit nicht nur auf eine Hemmung von Stoffwechselprozessen, die durch Insulin angeregt werden, sondern scheint weniger spezifisch zu sein, wenn man bedenkt, daß die geprüften Enzyme den Glucosetransport durch die Fettzellmembran wahrscheinlich über einen unterschiedlichen Grundmechanismus fördern. Dennoch muß an eine gemeinsame Eigenschaft dieser Verbindungen und des Insulins gedacht werden. Sie könnte darin bestehen, daß die räumliche Struktur und die Ladungsverteilung der Membran-Lipoproteine, zum Beispiel durch Übergang von laminarer zu globulärer Struktur (Rodbell 1966) verändert werden. Krahl (1961) hat vermutet, daß Insulin mit einem Lipoprotein in der Zellmembran reagiert, wodurch es zu einer Veränderung der Ladungsverteilung in der Membran mit daraus folgender Erleichterung des Glucoseeintritts durch intermolukulare Umlagerung in der Membran kommt. Dadurch würde die Transportrate in der Zeiteinheit meßbar vergrößert werden. Eine derartig vermehrte Erschließung von Transportwegen bzw. Carrier-

systemen wurde auch in späteren Arbeiten (Blecher 1965; Rodbell 1966; Kuo 1968) angenommen. Levine (1966) vermutet allerdings, daß von der Membran "Signale" ausgehen, die weitere intrazelluläre Wirkungen auslösen könnten. Nach seiner Theorie bahnt Insulin den Transport durch die Membran über die Ablösung eines "cover"s. Es dürfte sich dabei mittelbar um sterische oder konformative Veränderungen im Membranaufbau handeln. Phospholipase A und C verändern in geeigneter Konzentration ebenfalls die Membranstruktur (Blecher 1966, 1967; Rodbell 1966) im Sinne einer begrenzten Hydrolyse der Plasmamembran-Phospholipide. Dadurch wird die Ansprechbarkeit der Fettzellen auf Insulin herabgesetzt; die Hydrolyse kann aber auch bis zur Zerstörung oder Lysis der Membran führen. Insulin erzielt wahrscheinlich nur an intakten Membranen eine transportfördernde Wirkung. Zugabe von Eier-Lipoprotein verhindert den Wirkungsverlust des Insulins wie auch die Zellzerstörung (Rodbell 1966). Bemerkenswert ist die Tatsache, daß Phospholipase C genauso wie Insulin - vielleicht über die bereits erwähnten Signale Levines - die Proteinsynthese stimuliert und die angeregte Lipolyse von Fettzellen hemmt (Rodbell 1966; Rodbell u. Jones 1966). Diese Feststellung ließ die Autoren vermuten, daß Insulin und Phospholipase C einen gemeinsamen Angriffspunkt besitzen, zumal die Hemmung der Lipolyse unabhängig von der Stimulierung des Glucosetransports vor sich gehen soll. Blecher (1967) nahm für Phospholipase A und Insulin ein gleiches Glucosetransportsystem in der Fettzelle an.
Die vorliegenden Befunde an Adipocyten, deren Glucosetransport nach Vorinkubation mit Phospholipase A während der eigentlichen Meßperiode in Phospholipasefreiem Medium bestimmt wurde, lassen ebenfalls vermuten, daß das Enzym irreversible Veränderungen an der Membran erzeugt hat. Unter solchen Bedingungen steigt der Glucosetransport sogar auf das Vier- bis Fünffache des Kontrollwertes, wobei noch zu bedenken ist, daß die

Zellen durch Verluste beim Waschen und durch die Prozedur des Waschens insgesamt in ihrer Transportfähigkeit leiden. Dieser Befund läßt sich im Zusammenhang mit der konzentrationsabhängigen biphasischen Wirkung des Enzyms (Blecher 1967) erklären, indem die bei höheren Konzentrationen verursachten Hemmwirkungen auf den Glucosetransport die bei kleineren Konzentrationen hervorgerufenen anregenden Wirkungen der Phospholipase A überlagern.

Es ist nicht auszuschließen, daß Phospholipase A und die proteolytischen Fermente im Endeffekt ihre Wirkung an der Fettzellmembran über den gleichen Mechanismus ausüben, wobei Phospholipase A möglicherweise ein Vermittler für die Wirkungen von α-Chymotrypsin und Trypsin ist. Ottolenghi (1967) hat an Rattengeweben beobachtet, daß die Aktivität verschiedener endogener Phospholipasen durch proteolytisch wirksame Agentien und Enzyme auf das Vier- bis Fünffache gesteigert werden kann. Danach soll zum Beispiel Trypsin die Phospholipasen aktivieren, ohne die Hydrolyse der Phospholipide zu beeinflussen. Für die Aktivierung der Phospholipase wird die proteolytische Eigenschaft des Ferments selbst verantwortlich gemacht. Gleichartige Beobachtungen sind am Fettgewebe allerdings noch nicht gemacht worden. Interessant ist in diesem Zusammenhang, daß auch dem Insulin proteolytische Eigenschaften zugeschrieben werden (Rieser u. Rieser 1964 b). Nach Ansicht von Rieser u. Rieser (1964 a) sollen die Proteasen ähnlich wie Insulin nicht nur auf den Glucosetransport durch die Membran, sondern auch auf den intrazellulären Stoffwechsel der Glucose eine stimulierende Wirkung ausüben; die Autoren weisen in ihrer Arbeit auf eine Vermehrung der Glycogen-Synthetase durch die Pancreasfermente, wie sie auch durch Insulin auftritt, hin. Von gewisser Bedeutung scheint auch die Tatsache zu sein, daß α-Chymotrypsin die gleiche Histidin-Anordnung beiderseits der Disulfidbrücken am Cystein wie Insulin aufweist. Es ist die Frage gestellt

worden, ob der aktive Serin-Rest des α-Chymotrypsins und Trypsins der entscheidende Faktor für die insulinartige Wirkung dieser beiden Enzyme ist. Ball und Jungas (1964) sowie Kuo et al. (1967) vermuten, daß die Fähigkeit verschiedener Enzyme und Verbindungen, bestimmte Insulin-Wirkungen zu imitieren, auf deren Reaktionsfähigkeit mit SH-Gruppen an der Zellmembran zurückzuführen ist. Für die Annahme eines gemeinsamen Mechanismus von α-Chymotrypsin und Phospholipase A könnte der Befund sprechen, daß beide Substanzen, wenn sie zusammen in jeweils optimaler Konzentration eingesetzt werden, keine additive Steigerung der $^{14}CO_2$-Bildung bewirken im Vergleich zu der Steigerung, die beide Enzyme einzeln erzeugen. Dagegen kann die bei optimaler Konzentration von Phospholipase A hervorgerufene Stimulierung des Glucosetransports noch gesteigert werden, wenn zusätzlich Insulin in submaximaler Konzentration auf die Fettzelle einwirkt, was eher dafür spricht, daß hier unterschiedliche Wege der Transportsteigerung beschritten werden.

Offenbleiben muß zunächst die Frage, ob sich Membranveränderungen auch an inneren Membranen der Fettzellen abspielen und so weitere Stoffwechselwirkungen der Stimulantien erklären können. Immerhin hat Blecher (1965) die Möglichkeit angedeutet, daß der Wirkungsort von Insulin und Cortisol an einer inneren Lipid- oder Lipoprotein-Schicht der Zellgrenzmembran zu suchen ist.

Es bleibt auch die Frage zu diskutieren, in welcher Weise die untersuchten Diuretika Amilorid und Triamteren, deren besondere Eigenschaften im Vergleich zu anderen diuretisch wirksamen Substanzen anfangs erwähnt wurden, in den Vorgang des Glucosetransports durch die Fettzellmembran eingreifen. Diese Wirkung der Diuretika ist höchstwahrscheinlich reversibel; eigene Versuche bestätigen, daß nach Auswaschen der Diuretika mit normalem Medium der Glucosetransport durch Phospholipase A so stimuliert wird, als seien die Fett-

zellen vorher nicht in Gegenwart der Diuretika inkubiert worden. Die Sonderstellung von Amilorid und Triamteren, wie sie in ihrem Verhalten an der Fettgewebsmembran begründet ist, findet eine Parallele in unmittelbaren, anhaltenden und reversiblen Veränderungen an elektrischen Membrangrößen. Amilorid und Triamteren führen zum Verschwinden von Kurzschlußstrom und Membranpotential an der Außenseite der Krötenhaut (Baba et al. 1964; Eigler et al. 1967; Crabbé 1968). Dies hat zu der Vorstellung geführt, daß nicht die eigentliche, apikal gelegene Na^+-Pumpe der Tubuluszelle durch diese Substanzen beeinträchtigt wird, sondern membranständige Carrier, die sich an der Lumenseite befinden (Ehrlich und Crabbé 1968; Crabbé 1968). Es erscheint auch bedeutungsvoll, daß Amilorid und Triamteren von sich aus die $^{14}CO_2$-Bildung herabsetzen, sie wirken somit keineswegs nur spezifisch antagonistisch gegenüber einem der stimulierenden Agentien, deren Wirkung durch Anwesenheit der beiden Diuretika aufgehoben wird.

Die Annahme, daß möglicherweise Insulin durch die Diuretika funktionell ausgeschaltet wird, hat sich trotz der Tatsache, daß anscheinend alle durch Insulin stimulierbaren Stoffwechselprozesse (Förderung des Glucosetransports, der Glycogensynthese, der Proteinsynthese) einschließlich der Lipolysehemmung durch die Diuretika aufgehoben werden können, nicht beweisen lassen, da diese Hemmwirkungen eben nicht nur gegen Insulin zur Entfaltung kommen. Andererseits haben sich Anhaltspunkte für eine spezifische Wirkung der Diuretika bisher nicht nachweisen lassen. Es bleibt die Tatsache bestehen, daß verschiedene Stoffwechselprozesse, die untereinander wahrscheinlich unabhängig verlaufen, durch Amilorid und Triamteren im gleichen Sinne beeinflußt werden.

Die vorliegenden Befunde deuten darauf hin, daß Amilorid und Triamteren die Fettgewebsmembran funktionell so verändern, daß mögliche Eingriffe in den Membran-

aufbau durch Insulin, Phospholipase A oder proteolytische Fermente am Glucosetransportsystem unwirksam bleiben oder unwirksam werden. Ob und wie sich die beiden Substanzen an der Zellmembran binden, bedarf weiterer Klärung.

V. ZUSAMMENFASSUNG

1. An isolierten Fettzellen werden die Wirkungen von Amilorid und Triamteren auf die Lipolyse, auf die Enthemmung der Lipolyse und auf den Glucosetransport, der durch Phospholipase A, α-Chymotrypsin und Trypsin stimuliert wird, im Vergleich zu anderen gebräuchlichen Diuretika studiert.
2. Amilorid und Triamteren haben selbst keinen wesentlichen Einfluß auf die Lipolyse. Beide Substanzen heben die Hemmung, die Insulin auf eine durch Dexamethason + Wachstumshormon sowie durch Adrenalin stimulierte Lipolyse bewirkt, in einer Konzentration von 10^{-3} bzw. 2×10^{-4} M auf.
3. Amilorid und Triamteren hemmen die Glucoseaufnahme, die durch Phospholipase A, α-Chymotrypsin oder Trypsin in Fettgewebszellen angeregt wird, ebenso wie die durch Insulin. Ein Angriff von Amilorid und Triamteren an der Zellmembran ist wahrscheinlich.
4. Die Stimulierung des Glucosetransports in die Fettzellen nach Auswaschen der Phospholipase A bleibt bestehen und steigert sich auf das Vierfache des Kontrollwertes. Mit diesem Verfahren ist es somit möglich, die stimulierende Grundkomponente von der hemmenden Komponente abzutrennen.
5. Amilorid und Triamteren hemmen die Glucoseaufnahme, die durch Insulin (submaximale Konzentration) + Phospholipase A (optimale Konzentration) sowie durch Phospholipase A + α-Chymotrypsin (jeweils optimale Konzentration) additiv gesteigert wird, ebenso wie sie die einzelnen Stimulantien hemmen, wenn diese allein in optimaler Konzentration eingesetzt werden.
6. Die Diuretika Amilorid und Triamteren üben ihre Hemmwirkung auf den stimulierten Glucosetransport und die stimulierte Lipolyse isolierter Fettzellen wahrscheinlich an der Fettzellmembran aus, indem sie diese funktionell verändern.

VI. L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

1. Baba, W. I.,Tudhope, G. R. u. Wilson, G. M.:Site and mechanism of action of the diuretic triamterene. Clin. Sci. 27,181-193 (1964)

2. Baer, J. E., Jones, C. B., Spitzer, S. A. u. Russo, H. F.: The potassium-sparing and natriuretic activity of N-amidino-3,5-diamino-6-chloropyrazin carboxamide hydrochloride dihydrate (Amiloride hydrochloride). J. Pharmacol. exp. Ther. 157,472 -485 (1967)

3. Ball, G. M. u. Greene, J. A.: Localization of the site of action of triamterene diuretic. Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.) 113,326-328 (1963)

4. Ball, E. G. u. Jungas, R. L.: Some effects of hormones on the metabolism of adipose tissue. Rec. Progr. Hormone Res. 20,183-214 (1964)

5. Bartelheimer, H. K. u. Bruchhausen, F. v.: Unveröffentlichte Versuche (1966)

6. Beigelman, P. M. u. Hollander, P. B.: Effects of hormones upon adipose tissue membrane electrical potentials. Proc. Soc. exp. Biol. Med. (N. Y.) 116,31-35 (1964)

7. Blecher, M.: Phospholipase C and mechanisms of action of insulin and cortisol on glucose entry into free adipose cells. Biochem. Biophys. Res. Comm. 21,202-209 (1965)

8. Blecher, M.: On the mechanism of action of Phospholipase A and insulin on glucose entry into free adipose cells. Biochem. Biophys. Res. Comm. 23, 68-74 (1966)

9. Blecher, M.: Effects of insulin and Phospholipase A on glucose transport across the plasma membrane of free adipose cells. Biochem. Biophys. Acta (Amst.) 137,557-571 (1967a)

— Enzyme spezifity in the stimulation of glucose transport in the free adipose cells by phospholipases. Biochem. Biophys. Acta (Amst.) 137, 572-574 (1967 b)

10. Blecher, M.: Evidence for the involvement of cyclic-3,5-adenosine monophosphate in glucose utilization by isolated rat epididymal adipose cells. Biochem. Biophys. Res. Comm. 27, 560-567 (1967)

11. Blecher, M., Merlino, N. S. u. Roane, J. T.: Control of the metabolism and lipolytic effects of cyclic 3,5-adenosine monophosphate in adipose tissue by insulin, methylxanthines, and nicotinic acid. J. Biol. Chem. 243, 3973-3977 (1968)

12. Bleicher, S. J., Farber, L., Lewis, A. u. Goldner, M. G.: Electrolyte-activated lipolysis in vitro modifying effect of calcium. Metabolism Clin. Exp. 15, 742-748 (1966)

13. Bleicher, S. J., Lewis, A., Farber, L. u. Goldner, M. G.: Effect of mono- and divalent cations on in vitro lipolysis Proc. Soc. Exp. Biol. and Med. 121, 980-82 (1966 b)

14. Bray, C. A.: Inhibition of glucose oxidation in adipose tissue by dibutyryladenosine-3,5-phosphate. Biochem. Biophys. Res. Comm. 28, 621-627 (1967)

15. Bruchhausen, F. v.: Hemmung des α-Aminoisobuttersäure-Transportes in das isolierte Fettgewebe durch $N^6.O^2$-Dibutyryl-Adenosin-3,5-Phosphat. Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chemie 349, 1437-1439 (1968)

16. Bruchhausen, F. v. u. Bartelheimer, H. K.: Veränderungen von Elektrolytbewegungen durch Diuretika an isoliertem Fettgewebe. Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmak. exp. Path. 260, 97-98 (1968)

17. Bruchhausen, F. v., Herken, H., Voss, H. J. u. Merker, H.-J.: Wirkung von Triamteren auf insulinstimulierbare Prozesse des Fettgewebes. Naunyn-

Schmiedebergs Arch. Pharmak. exp. Path. 256, 416-429 (1967)

18. Bruchhausen, F. v., Kaiser, I. u. Herken, H.: Über Wirkungen von N-Amidino-3,5-diamino-6-chloro-pyrazincarboxamid (Amilorid) auf den Glucosetransport und die Proteinsynthese des epididymalen Fettgewebes der Ratte. Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmak. exp. Path. 262, 139-151 (1969)

19. Butcher, R. W., Baird, C. E. u. Sutherland, E. W.: Effects of lipolytic and antilipolytic substances on adenosine-3,5-monophosphate levels in isolates fat cells. J. Biol. Chem. 243, 1705-1712 (1968)

20. Butcher, R. W., Sneyd, J. G. T., Park, C. R. u. Sutherland, E. W.: Effect of insulin on adenosine-3,5-monophosphate in the rat epididymal fat pad. J. Biol. Chem. 241, 1651-1653 (1966)

21. Crabbé, J.: A hypothesis concerning the mode of action of amiloride and of triamterene. Arch. int. Pharmacodyn. 173, 474-477 (1968)

22. Crofford, O. B. u. Renold, A. E.: Glucose uptake by incubated rat epididymal adipose tissue. Rate limiting steps and site of insulin action. J. Biol. Chem. 240, 14-21 (1965)
– Glucose uptake by incubated rat epididymal adipose tissue. Characteristics of the glucose transport system and action of insulin. J. Biol. Chem. 240, 3237-3244 (1965)

23. Ehrlich, E. N. u. Crabbé, J.: The mechanism of action of amipramizide. Pflügers Arch. 302, 79-96 (1968)

24. Eigler, J., Kelter, J. u. Renner, E.: Wirkungscharakteristika eines neuen Acylguanidins - Amiloride-HCl (MK 870) - an der isolierten Haut von Amphibien. Klin. Wschr. 45, 737-738 (1967)

25. Fain, J. N.: Adrenergic blockade of hormone-induced lipolysis in isolated fat cells. Ann. N. Y. Acad.

Sci. 139, 879-890 (1967)

26. Fain, J. N., Kovacev, V. P. u. Scow, R. O.: Effect of growth hormone and dexamethasone on lipolysis and metabolism in isolated fat cells of the rat. J. Biol. Chem. 240, 3522-29 (1965)

27. Fain, J. N., Kovacev, V. P. u. Scow. R. O.: Anti-lipolytic effect of insulin in isolated fat cells of the rat. Endocrinology 78, 773-778 (1966)

28. Fain, J. N.: Studies on the role of RNA and protein synthesis in the lipolytic action of growth hormone in isolated fat cells. Advances in Enzyme Regulation 5, 39-51 (1967)

29. Hanahan, D. J. u. Olley, J. N.: Chemical nature of monophosphoinositides. J. Biol. Chem. 231, 813-828 (1958)

30. Jungas, R. L.: Role of cyclic-3,5-AMP in the response of adipose tissue to insulin. Proc. Nat. Acad. Sci. 56, 757-763 (1966)

31. Jungas, R. L. u. Ball, E. G.: Studies on the metabolism of adipose tissue XII. The effects of insulin and epinephrine on free fatty acid and glycerole production in the presence and absence of glucose. Biochemistry 2, 383-388 (1963)

32. Krahl, M. E.: The action of insulin on cells. New York: Academic Press 1961

33. Kuo, J. F., Dill, J. K. u. Holmlund, C. E.: Effects of arsenite on lipolysis and metabolism of glucose, palmitic acid, and amino acids by isolated adipose cells. Biochem. Biophys. Acta 148, 683-688 (1967)

34. Kuo, J. F.: Comparisons of the effects of Bacillus subtilis protease, type VIII (Subtilopeptidase A) and insulin on isolated fat cells. J. Biol. Chem. 243, 211-215 (1968)

35. Letarte, J. u. Renold, A. E.: Glucose metabolism in

fat cells stimulated by insulin and dependent on sodium. Nature 215, 961-962 (1967)

36. Levine, R.: The action of insulin at the cell membrane. Amer. J. Med. 40, 691-693 (1966)
- The place of insulin and glucagon in the regulation of carbohydrate metabolism. In: D-Glucose und verwandte Verbindungen in Medizin und Biologie (Bartelheimer, Heyde u. Thorn, ed.). Stuttgart: Enke 1966 b

37. Miller, L. V., Schlosser, G. H. u. Beigelman, P. M.: Electrical potentials of isolated fat cells. Biochem. Biophys. Acta (Amst.) 112, 375-376 (1966)

38. Mosinger, B. u. Kujalovà, V.: Potassium-dependent lipomobilizing effect of adrenaline on incubated adipose tissue. Biochem. Biophys. Acta 116, 174-177 (1966)

39. Mosinger, B., Vaughan, M.: The action of cyclic-3,5-adenosinmonophosphate on lipolysis in rat adipose tissue. Biochem. Biophys. Acta 144, 569-582 (1967)

40. Müller-Oerlinghausen, B., Schwabe, U., Hasselblatt, A. u. Schmidt, F. H.: Activity of 3,5-AMP phosphodiesterase in liver and adipose tissue of normal and diabetic rats. Life Sci. 7, 593-598 (1968)

41. Ottolenghi, A.: Phospholipase activity of rat tissues and its modification by trypsin. Lipids 2, 303-307 (1967)

42. Pätau, K.: Zur statistischen Beurteilung von Messungsreihen (eine t-Tafel). Biol. Zbl. 63, 152-168 (1943)

43. Rapport, M. M. u. Alonzo, N.: Photometric determination of fatty acid ester groups in phospholipides. J. Biol. Chem. 217, 193-198 (1955)

44. Rieser, P. u. Rieser, C. H.: Anabolic responses of diaphragm muscle to insulin and to other pancreatic proteins. Proc. Soc. Exper. Biol. Med. 116, 669-671 (1964 a)

- Insulin-catalized proteolysis. Biochem. Biophys. Research Comm. 17, 373-376 (1964 b)

45. Rizack, M. A.: Activation of an epinephrine-sensitive lipolytic activity from adipose tissue by adenosine-3,5-phosphate. J. Biol. Chem. 239, 392-395 (1964)

46. Rodbell, M.: Metabolism of isolated fat cells I. Effects of hormones on glucose metabolism and lipolysis. J. Biol. Chem. 239, 375-380 (1964)

47. Rodbell, M.: Metabolism of isolated fat cells II. The similar effects of phospholipase C (Clostridium perfringens α-toxin) and of insulin on glucose and amino acid metabolism. J. Biol. Chem. 241, 130-139 (1966)

48. Rodbell, M. u. Jones, A. B.: Metabolism of isolated fat cells III. The similar inhibitory action of phospholipase C (Clostridium perfringens α-toxin) and of insulin on lipolysis stimulated by lipolytic hormones and theophylline. J. Biol. Chem. 241, 140-143 (1966)

49. Senft, G., Losert, W., Schultz, G., Sitt, R. u. Bartelheimer, K. H.: Ursachen der Störungen im Kohlenhydratstoffwechsel unter dem Einfluß sulfonamidierter Diuretika. Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmak. exp. Path. 255, 369-382 (1966)

50. Schultz, G., Senft, G., Losert, W. u. Sitt, R.: Biochemische Grundlagen der Diazoxid-Hyperglykämie. Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmak. exp. Path. 253, 372-385 (1966)

51. Sneyd, J. G. T., Corbin, J. D. u. Park, C. R.: The role of cyclic AMP in the action of insulin. Advanc. exp. Med. 2, 367-376 (1968)

52. Wiebelhaus, V. D., Weinstock, J., Maass, A. R., Brennan, F. T., Sosnowski, G. u. Larsen, T.: The diuretic and natriuretic activity of triamterene

and several related pteridines in the rat. J. Pharmacol. exp. Ther. 149, 397-403 (1965)

53. Zierler, K. L.: Effect of insulin on membrane potential and potassium content of rat muscle. Amer. J. Physiol. 197, 515-523 (1959)
- Hyperpolarization of muscle by insulin in a glucose-free environment. Amer. J. Physiol. 197, 524-526 (1959)

Für die freundliche Überlassung des Themas dieser Dissertation sowie für wertvolle Ratschläge und Anregungen möchte ich Herrn Dr. F. v. Bruchhausen herzlich danken.

Herrn Prof. Herken danke ich für die guten Arbeitsmöglichkeiten im Pharmakologischen Institut der Freien Universität Berlin, den techn. Assistentinnen und meinen Kollegen für ihre Hilfe bei der technischen Durchführung meiner Untersuchungen.

Lebenslauf

Ich wurde am 23. Februar 1942 in Platkow (Mark Brandenburg) als Sohn des Lehrers Walter Streubel und seiner Ehefrau Else geboren.
Von 1948 bis 1952 besuchte ich die Volksschule in Burgdorf/Hann. und anschließend das Gymnasium in Lehrte/Hann., wo ich im Frühjahr 1961 die Reifeprüfung bestand. Im Sommersemester 1961 nahm ich das Studium der Medizin an der Freien Universität in Berlin auf. Dort legte ich nach zwei Semestern das Vorphysikum und nach weiteren drei Semestern auch das Physikum erfolgreich ab. Nach sechs klinischen Semestern bestand ich - ebenfalls an der Freien Universität Berlin - am 13. September 1967 das Staatsexamen. Während der ersten zehn Monate meiner Medizinalassistentenzeit konnte ich die Untersuchungen zu der vorliegenden Dissertation durchführen.
Am 19. Juli 1968 heiratete ich die Steuerobersekretärin Renate Tabbert.
Seit Oktober 1969 bin ich in der Chirurgischen Abteilung des Städt. Krankenhauses Berlin/Neukölln beschäftigt.

B. Ladewig · Dissertationsdruck · 1 Berlin 12 · Pestalozzistr. 105 · Tel. 318885